昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2009, 52(6): 595-603　　ISSN 0454-6296

家蚕转基因技术中若干因素对转基因效率的影响

马三垣，徐汉福，段建平，赵爱春，张美蓉，夏庆友*
（西南大学蚕学与系统生物学研究所农业部蚕学重点开放实验室，重庆　400716）

摘要：建立高效、稳定的家蚕 *Bombyx mori* 转基因技术对于推进家蚕功能基因组研究，解决蚕丝产业重大问题以及向非绢丝产业拓展等具有重要意义。本文在已建立的基于 *piggy*Bac 的家蚕转基因技术基础上，探索了多个影响转基因效率的因素。结果显示：以家蚕品种大造（P50）为供试材料、pBac[GOI]为供体质粒、pHA4PIG 为辅助质粒，以眼睛和神经组织特异启动子 3×p3 启动的红色荧光蛋白基因 *DsRed* 为报告基因，在蚕卵产下后 2～3 h 进行注射，综合效果最佳，孵化率和转化率分别达到 62.7% 和 34.8%；荧光筛选的最佳时期在胚胎发育第 5 到第 8 天；在2 000～8 000 bp 之间时，外源片段的长度对转化率并无太大影响。本研究建立的技术体系，有望为家蚕功能基因研究、品种分子改良和家蚕生物反应器的开发奠定基础，并为其他鳞翅目昆虫转基因技术的建立提供参考。

关键词：家蚕；*piggy*Bac；转基因技术；孵化率；转化率；蚕品种；供体质粒；辅助质粒；显微注射；荧光筛选；荧光标记
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)06-0595-09

Effect of several factors on the transformation efficiency in the transgenic technology of silkworm, *Bombyx mori*

MA San-Yuan, XU Han-Fu, DUAN Jian-Ping, ZHAO Ai-Chun, ZHANG Mei-Rong, XIA Qing-You* (Key Sericultural Laboratory of the Ministry of Agriculture, Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Efficient transgenic technology of silkworm is the key to promote the functional research of silkworm genome, and to solve the major problems in the sericulture industry. On the basis of the established transgenic technology in silkworm, we investigated the effect of several factors on transformation efficiency. The results showed that when taking P50 as a recipient strain, pBac[GOI] as a donor plasmid and pHA4PIG as a helper plasmid, and red fluorescent protein gene, *DsRed*, driven by an eye-specific promoter, 3×p3, as a reporter gene, microinjection into the eggs during 2-3 h after oviposition increased the transformation efficiency. The hatching rate of injected eggs and the transformation rate were 62.7% and 34.8%, respectively. The best time for fluorescent screening was the 5th to 8th day of embryo. The results also showed that when varied from 2 000 to 8 000 bp the length of inserts had no significant effect on transformation rate. The results will set a model for transgensis of other lepidopteran insects and will contribute to the functional genomics study of the silkworm and the development of molecular bioreactors involved.

Key words: *Bombyx mori*; *piggy*Bac; transgenic technology; hatching rate; transformation rate; silkworm strains; donor plasmid; helper plasmid; microinjection; fluorescent screening; fluorescent marker

家蚕 *Bombyx mori* 是迄今人类完全驯化并得以充分利用的唯一昆虫种类。家蚕不仅在绢丝产业领域功勋卓著，而且由于其具有遗传背景清楚，遗传资源丰富，丝蛋白合成、分泌及修饰加工的高效能力，昆虫变态发育和微生物抵抗性的典型特征，以及作为寡食性昆虫代表，可研究昆虫与植物和病原微生物之间复杂的相互作用等特点，使其成为研究鳞翅目昆虫的重要模式生物。家蚕还在昆虫工厂、

基金项目：国家“973”计划项目(2005CB121000)；重庆市院士基金(CSTC2006AA5019)
作者简介：马三垣，男，1985 年生，重庆人，硕士研究生，主要从事家蚕转基因与遗传工程研究，E-mail：mg072206@126.com
*通讯作者 Author for correspondence, E-mail：xiaqy@swu.edu.cn
收稿日期 Received：2008-12-10；接受日期 Accepted：2009-04-02

生物医药、农林害虫防治等非绢丝产业领域也显示出广阔的开发前景。

模式生物研究的诸多进展表明，以转基因技术为核心的遗传转化工具在各种模式生物的功能基因研究中发挥了极其重要的作用。高效、稳定的转基因技术已成为开展模式生物研究的必备技术之一。家蚕转基因技术在实现特定基因功能的丧失或获得以及开发新型遗传素材和生物反应器等方面有着其他技术难以比拟的优势。特别是自家蚕基因组计划成功实施以来（Xia *et al*., 2004），家蚕转基因技术的研究更是受到国内外本领域研究人员的高度关注，并在前期探索的基础上，就电穿孔、基因枪、精子介导、同源重组、显微注射以及病毒介导等方法进行了研究（Tatuma *et al*., 2000；郭秀洋等，2001；Guo *et al*., 2004），其中最为著名的当推利用粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的 *piggy*Bac 转座子介导的家蚕早期胚胎显微注射技术（Tatuma *et al*., 2000）。在此基础上，国内外研究人员先后报道了家蚕转基因的成功及其在功能基因研究和生物反应器方面的应用（Thomas *et al*., 2002；Imamura *et al*., 2003；Ogawa *et al*., 2007；Sakudoh *et al*., 2007；Zhong *et al*., 2007）。该方法具有相对高效、转基因后代稳定遗传等优点，已成为目前获得转基因蚕的主要技术。

近年来，尽管这种基于 *piggy*Bac 的显微注射早期胚胎的转基因家蚕技术取得了较大进展，但从实际应用情况来看，该技术的转化效率与果蝇等模式生物的转基因效率相比还有一定差距（Li *et al*., 2005），因此从技术层面尚有很大的优化提升空间；而且，从家蚕转基因技术应用的现实要求出发，进一步提高家蚕转基因的效率也非常必要。本文针对可能影响家蚕转基因效率的各个关键环节，主要包括蚕品种、质粒载体骨架、显微注射时间、荧光筛选时间、荧光标记的类型等，进行了不同条件下的技术优化和比较，旨在提高家蚕转基因效率，为该领域的研究与应用提供有用参考。

1 材料与方法

1.1 家蚕品种

实验用家蚕品种 N4（Nistari）和大造（P50）均由西南大学家蚕基因资源库保存，871（原种）、秋丰（原种）和碧·波（双交原种）由四川省南充蚕种场提供。幼虫在 25℃、相对湿度 75% 的环境下采用桑叶或人工饲料（Izumi-Ku，Yokohama，日本）饲养。

1.2 质粒载体

本研究所用的 *piggy*Bac 供体质粒 pBac[GOI] 和 pXL-Bac Ⅱ[GOI]（GOI 即 genes of interest，下同）均由本室构建或改造，编号如表 1 所示。辅助质粒 pHA3PIG 为日本蚕业和昆虫科学研究所 Tamura Toshiki 教授惠赠，pHA4PIG 为本室构建。注射用质粒 DNA 采用 Introgen 试剂盒（大连生工）抽提。

1.3 胚胎制备与显微注射

将交配后的雌蛾投放于上浆的蚕连纸上，使其在黑暗的环境中产卵。其中，大造所产蚕卵为上代低温催青解除滞育，871、秋丰和碧·波所产蚕卵为当代早期浸酸解除滞育。每间隔 0.5 h 收集一次蚕卵并将其整齐排列于载玻片上（大约 100 粒/片），经 35% ~37% 的甲醛蒸气消毒 5 min 后用显微注射仪（Eppendorf，德国）进行注射，注射操作均在蚕卵产下后 60 ~220 min 期间完成。注射质粒按供体质粒: 辅助质粒 =1∶1（物质的量之比）混合至终浓度为 400 ng/μL，每粒蚕卵注射 10 ~15 nL。注射后立即用无毒胶水（Instant Strong Glue Mini，日本）封闭注射孔，经甲醛蒸气再次消毒后，置于 25℃、相对湿度 85% 以上的条件下催青直至蚕卵孵化，蚕卵孵化后按注射载体种类分区饲养。

1.4 荧光筛选

将 G0 代的蚕蛾采用自交或回交制种，获得的 G1 代蚕卵、幼虫、蛹或蛾在宏观体视荧光显微镜（Olypus MVX10，日本）下检测，筛选出发荧光的转基因阳性个体，并以蛾圈为单位进行单独饲育。

1.5 数据分析

注射时间：将收集蚕卵时间记为 T_1，注射操作完成时间为 T_2，每张载玻片的蚕卵注射时间 $T_s = T_2 - T_1$，每个载体的注射时间（T_v）等于该载体所有注射单位（一张载玻片为一个注射单位）T_s 的加权平均数。

孵化率：每张载玻片的实际注射卵粒数为 N_i，孵化数（按空卵壳数统计）为 N_h，每张载玻片的蚕卵孵化率 $H_s = N_h/N_i \times 100\%$，每个注射载体的孵化率（$H_v$）等于该载体所有注射单位 H_s 的加权平均数。

转化率：G0 代蚕蛾采用区内自交或回交制种，产下 G1 代蚕卵的总蛾圈数为 B_1，筛选出阳性个体的阳性蛾圈数为 B_2，每个注射载体的转化率 $F_v = B_2/B_1 \times 100\%$。

统计不同供体质粒、辅助质粒、插入片段长度、家蚕品种以及荧光标记的转化率，并以 20 min 为一个时间段，统计不同注射时间的孵化率和转化率。

其中，8 585 粒大造蚕卵的注射结果用于分析注射时间与孵化率的关系；6 542 粒大造蚕卵和 13 870 粒 N4 蚕卵的注射结果用于分析注射时间与转化率的关系；不同品种的孵化率与转化率的比较则分别使用了 N4、大造、871、秋丰和碧・波的注射结果，注射蚕卵数分别为 13 623，6 542，869，1 041 和 2 519粒。上述数据统计与分析均在 Excel 2003 中完成。

2　结果与分析

2.1　显微注射及转基因蚕的获得

将构建或改造后的 34 个 *piggy*Bac 表达载体与辅助质粒（pHA3PIG 或 pHA4PIG）等量混合后分别注射 N4、871、秋丰、大造和碧・波的早期胚胎，在 G1 代的卵期或者幼虫期进行荧光检测。实验结果共筛选出 3 790 头阳性个体，建立了 32 个稳定的转基因系统（表 1）。注射后的蚕卵平均孵化率为 19.8%，平均转化率达 28.7%，与已有的报道（转化率平均为 5.8%）相比，本实验的转基因效率较高。转基因家蚕不同时期的荧光检测结果参见下文图 7。

2.2　不同条件下家蚕转基因效率的比较分析

2.2.1　不同注射时间对孵化率的影响：注射后，蚕卵能够正常发育是家蚕转基因成功的首要前提。由于胚胎制备所需时间和有效转座发生的时间本身也难以准确界定，我们便以精卵结合（约产卵后 120 min）时间为中心点，调查了产卵后 60 ~ 220 min内注射操作对蚕卵孵化率的影响（图 1）。从图 1 中可以看出，从 60 ~ 80 min 的37.4% 到 200 ~ 220 min 的 76.0%，孵化率随注射时间的延后而呈上升趋势，显示注射操作的影响随着该时间段内胚胎的发育而逐渐减弱。

2.2.2　不同 *piggy*Bac 供体质粒的转化率：目前家蚕转基因所使用的 *piggy*Bac 转座载体（两臂分别为 1 050 和 674 bp，以 pBac［GOI］表示）（图 2：A）均与 Tamura 等（2000）所使用的载体骨架相同。但在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等物种中的研究结果显示，采用两臂组合更短的 *piggy*Bac 转座载体（两臂分别为 235 和 311 bp，以 pXL-BacⅡ［GOI］表示）（图 2：A）能产生更高的转座效率（Li *et al.*，2005）。本文分别以上述两种载体为骨架构建了 13 和 8 个转基因载体，分别与 pHA3PIG 等量混合后注入 17 186 和 10 684 粒 N4 的蚕卵，筛选获得了 1 002和 0 头转基因蚕，转化率分别为 27.1% 和 0.0%（图 2：B）。结果表明，pXL-BacⅡ［GOI］在家蚕中不具有或者具有极低的转座效率，而 pBac［GOI］在家蚕中可以介导较为高效的转座事件。

2.2.3　不同辅助质粒的转化率：注射蚕卵中转座酶的类型及其表达和分布情况决定了转座是否发生、何时发生和在何位置发生，故辅助质粒的启动子特征对转基因的效率可能有显著影响。为了寻找在蚕卵内启动能力更强、作用更为广谱、有助于提高转座效率的启动子，本文以 N4 为材料，比较了以家蚕肌动蛋白 A3 和 A4 为启动子的两种辅助质粒 pHA3PIG 和 pHA4PIG（Tamura *et al.*，2000；张美蓉等，2007）（图 3：A）介导的转基因效率。结果显示：pHA4PIG 介导的转基因效率为 31.0%，而 pHA3PIG 为 24.6%，前者略高于后者（图 3：B）。提示，尽管 A3 和 A4 启动子在蚕卵中都能启动转座酶表达并诱导转座，但二者之间的启动活性可能有所区别。

2.2.4　不同注射时间对转化率的影响：在发生有效转座的时间段内，转座事件发生的部位、频率和次数决定了阳性蛾圈率的高低以及阳性个体数的多少。家蚕胚胎系先行核分裂发育，当且仅当转座事件发生在生殖极的原始生殖细胞时才能产生可稳定遗传的转基因个体，故显微注射时间对家蚕转基因效率有着重要影响。考虑到大造产卵快而 N4 产卵较慢的特性，我们对前者在产卵后 80 – 180 min 的时间内进行注射，而对 N4 是在产后 120 – 220 min 内进行注射。结果显示：在上述时间段内，转化率随注射时间的延后而总体上呈下降趋势；大造的转化率在 140 ~ 160 min 的时间段最高，N4 在 120 ~ 140 min 时间段的转化率较之后的时间段略高，此后随注射时间的延迟而降低（图 4）。结果暗示，不同家蚕品种的最佳转座时间可能存在一定的差异。

2.2.5　不同载体长度对转化率的影响：以转座子为介导的转基因效率，同时还受转座载体承载的外源片段长度的影响。为了调查外源片段长度对 *piggy*Bac 介导的转座效率的影响，我们将不同长度的外源片段插入到 pBac［GOI］载体中，各表达载体与辅助质粒 pHA3PIG 等量混合后进行显微注射（表 1）。结果表明：当外源片段长度在 2 000 ~ 8 000 bp 之间时，外源片段的长度对转化率并无太大影响，且转化率大都集中在 20.0% ~40.0%之间（图 5）。

表 1　显微注射结果

Table 1 Microinjection of piggyBac-derived vectors in silkworm embryos

注射载体名称 Name of injected vectors	插入片段长度 Length of inserted fragments (bp)	品种 Silkworm strains	辅助质粒 Helper plasmids	注射卵粒数 Number of eggs injected	孵化数(率[d]) Number of hatched eggs (Percentage)	检测蛾圈数 Number of screened broods	阳性蛾圈数(率[e]) Number of positive broods (Percentage)	阳性个体数 Number of positive individuals
pXL-Bac[A4DsRed]	3 200	N4	pHA3PIG	4 805	1 068(22%)	225	0(0%)	0
pXL-Bac[E01[a]-3×p3[b]DsRed]	2 900	N4	pHA3PIG	1 542	49(3%)	20	0(0%)	0
pXL-Bac[E02-3×p3DsRed[c]]	2 900	N4	pHA3PIG	216	7(3%)	4	0(0%)	0
pXL-Bac[E03-3×p3DsRed]	2 900	N4	pHA3PIG	154	1(1%)	1	0(0%)	0
pXL-Bac[E04-3×p3DsRed]	2 900	N4	pHA3PIG	1 000	380(38%)	0	0(0%)	0
pXL-Bac[E05-3×p3EGFP]	2 900	N4	pHA3PIG	797	65(8%)	34	0(0%)	0
pXL-Bac[E06-3×p3DsRed]	2 900	N4	pHA3PIG	728	103(14%)	41	0(0%)	0
pXL-Bac[E07-3×p3EGFP]	2 900	N4	pHA3PIG	2 984	1 226(41%)	0	0(0%)	0
pBac[3×p3EGFP[c]]	2 860	N4	pHA4PIG	753	138(18%)	42	13(31%)	163
pBac[3×p3EGFP]	2 860	N4	pHA3PIG	1 388	60(4%)	21	1(5%)	1
pBac[A3EGFP]	4 480	N4	pHA3PIG	1 267	111(9%)	42	3(7%)	10
pBac[E08-3×p3DsRed]	5 100	N4	pHA3PIG	1 021	164(16%)	42	13(31%)	90
pBac[E09-3×p3EGFP]	4 100	N4	pHA3PIG	279	120(43%)	44	13(30%)	116
pBac[E10-3×p3DsRed]	4 220	N4	pHA3PIG	478	38(8%)	5	4(80%)	23
pBac[E11-3×p3DsRed]	4 220	N4	pHA3PIG	766	225(29%)	62	20(32%)	177
pBac[E12-3×p3DsRed]	4 232	N4	pHA3PIG	1 367	158(12%)	50	7(14%)	35
pBac[E13-3×p3DsRed]	6 970	N4	pHA3PIG	708	170(24%)	49	21(43%)	236
pBac[E14-3×p3DsRed]	5 670	N4	pHA3PIG	400	41(10%)	25	4(16%)	23
pBac[E15-3×p3DsRed]	5 235	N4	pHA3PIG	697	293(42%)	25	7(28%)	98
pBac[E16-3×p3DsRed]	4 797	N4	pHA3PIG	1 146	157(14%)	30	8(27%)	41
pBac[E17-3×p3EGFP]	5 464	N4	pHA3PIG	1 261	366(29%)	35	7(20%)	124
pBac[E18-3×p3DsRed]	4 230	N4	pHA3PIG	2 092	82(4%)	25	4(16%)	28
pBac[E19-3×p3DsRed]	4 716	大造 P50	pHA3PIG	496	195(39%)	30	11(37%)	193
pBac[E20-3×p3EGFP]	4 854	大造 P50	pHA3PIG	512	250(49%)	25	8(32%)	54
pBac[E21-3×p3EGFP]	5 190	大造 P50	pHA3PIG	304	143(47%)	28	10(36%)	56
pBac[E15-3×p3DsRed]	5 235	大造 P50	pHA3PIG	449	293(65%)	24	9(38%)	72
pBac[E16-3×p3DsRed]	4 797	大造 P50	pHA3PIG	477	252(53%)	48	15(31%)	85
pBac[E22-3×p3DsRed]	7 336	大造 P50	pHA3PIG	503	221(44%)	23	11(48%)	113
pBac[E23-3×p3EGFP]	4 780	大造 P50	pHA3PIG	617	454(74%)	51	12(24%)	44
pBac[E24-3×p3EGFP]	4 780	大造 P50	pHA3PIG	623	450(72%)	23	13(57%)	102
pBac[E25-3×p3EGFP]	4 798	大造 P50	pHA3PIG	654	287(44%)	29	12(41%)	67
pBac[E17-3×p3EGFP]	5 464	大造 P50	pHA3PIG	290	145(50%)	42	12(29%)	195
pBac[E26-3×p3EGFP]	4 597	大造 P50	pHA3PIG	651	506(78%)	64	29(45%)	316
pBac[E27-3×p3EGFP]	4 775	大造 P50	pHA3PIG	966	698(72%)	91	28(31%)	159
pBac[E28-3×p3DsRed]	10 000	秋丰 Qiufeng	pHA4PIG	529	95(18%)	22	1(5%)	51
pBac[E29-3×p3DsRed]	5 670	秋丰 Qiufeng	pHA4PIG	512	61(12%)	2	1(50%)	1
pBac[E30-3×p3EGFP]	4 248	871	pHA3PIG	428	152(36%)	30	6(20%)	84
pBac[E31-3×p3DsRed]	5 670	871	pHA4PIG	441	40(9%)	5	1(20%)	10
pBac[E29-3×p3DsRed]	5 670	碧・波 Bibo	pHA4PIG	1 019	18(2%)	23	1(4%)	3
pBac[E14-3×p3DsRed]	5 670	碧・波 Bibo	pHA3PIG	1 500	73(5%)	16	3(19%)	18

a: E01～E30，表示不同的外源基因 Serial numbers of foreign genes; b: 3×p3，人工合成的启动子 An artificial promoter; c: EGFP 和 DsRed 分别为增强型绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白 EGFP and DsRed represent enhanced green and red fluorescent protein, respectively; d: 孵化率 =（孵化数/注射总粒数）×100% Hatching rate = (number of hatched)/(number of injected) ×100%; e: 阳性蛾圈率 =（阳性蛾圈数/检测蛾圈数）×100% Transformation rate = (number of positive broods)/(number of screened broods) ×100%.

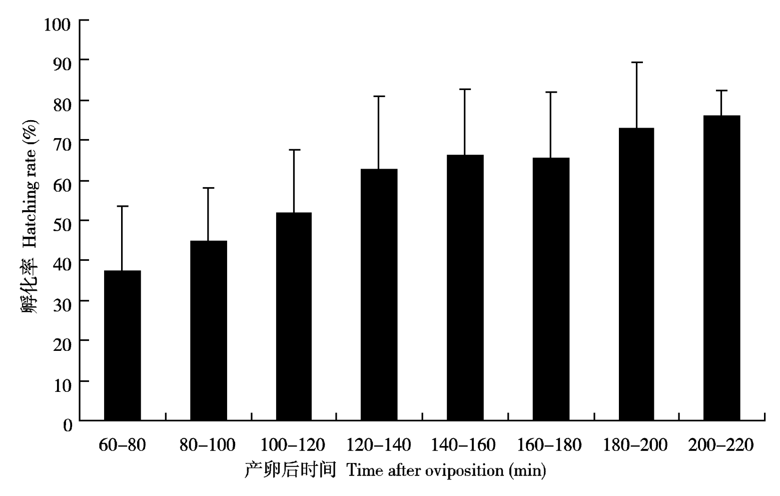


图 1　不同注射时间处理的家蚕卵孵化率

Fig. 1　Hatching rate of *Bombyx mori* eggs in treatments of different microinjection time

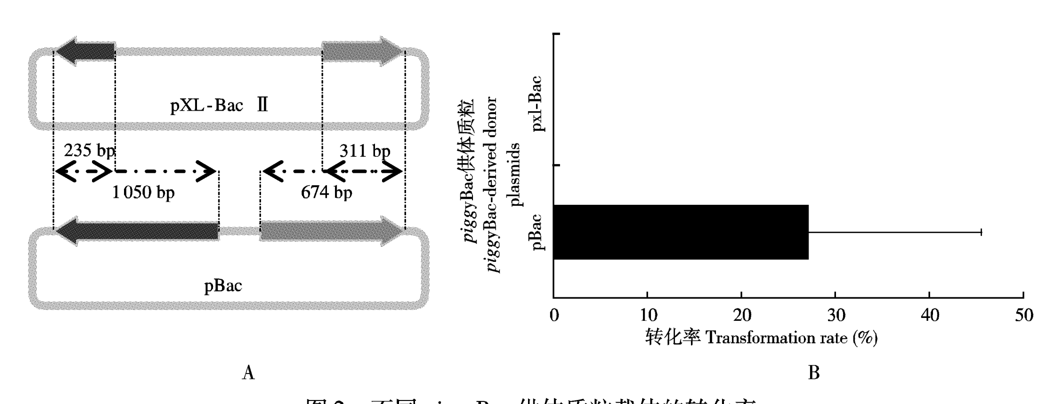


图 2　不同 *piggy*Bac 供体质粒载体的转化率

Fig. 2　Transformation rate of different *piggy*Bac-derived donor plasmids

A：两种供体质粒结构示意图 A schematic diagram of two donor plasmids；B：两种供体质粒的转化率 The transformation efficiency of the two donor plasmids.

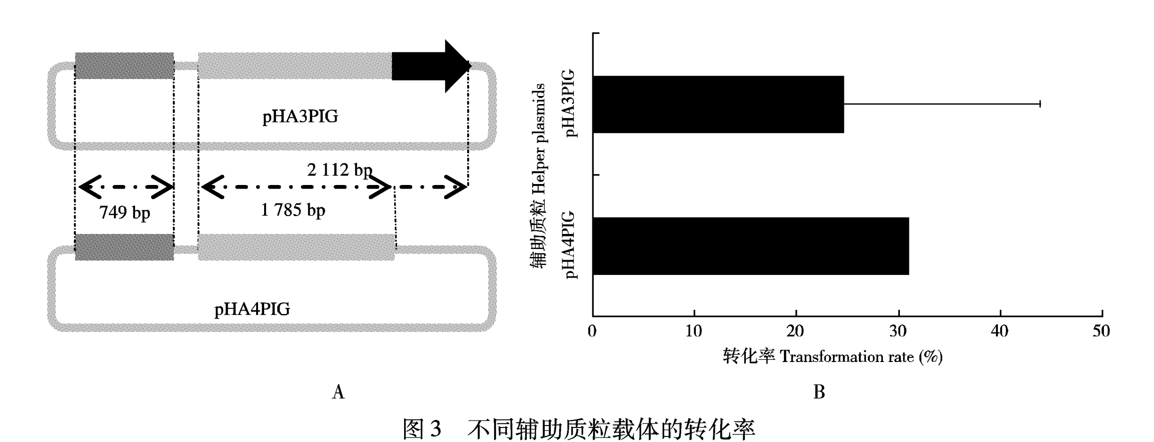


图 3　不同辅助质粒载体的转化率

Fig. 3　Transformation rate from different helper plasmids

A：两种辅助质粒结构示意图 A schematic diagram of two helper plasmids；B：两种辅助质粒的转化率 The transformation efficiency of the two helper plasmids. 注射品种为 N4，其中 pHA4PIG 注射了 1 个载体，pHA3PIG 注射 13 个载体。The silkworm strain is N4；1 and 13 donor plasmids were co-injected with pHA4PIG and pHA3PIG，respectively.

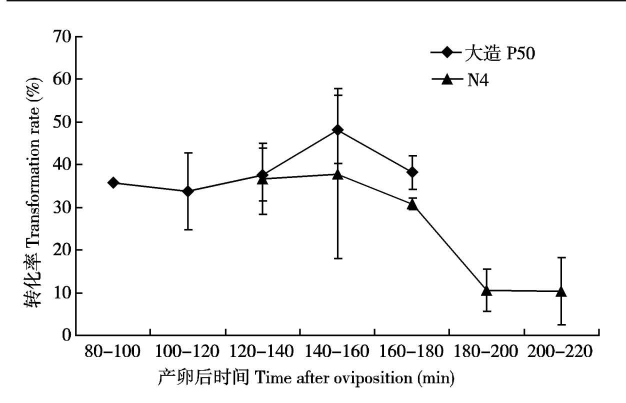


图 4 不同注射时间处理的家蚕转化率

Fig. 4 Transformation rate of *Bombyx mori* eggs in treatments of different microinjection time

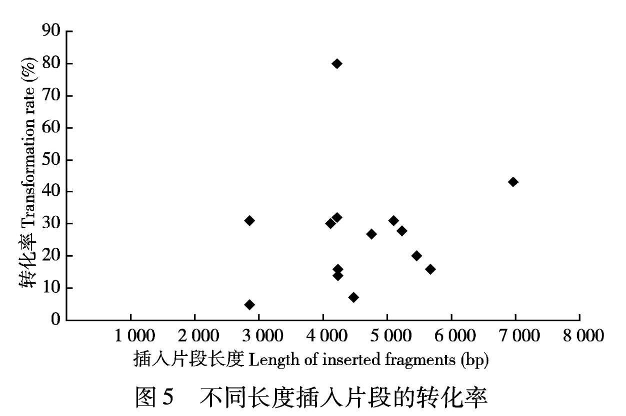


图 5 不同长度插入片段的转化率

Fig. 5 Transformation rate responding to the length of inserted fragments

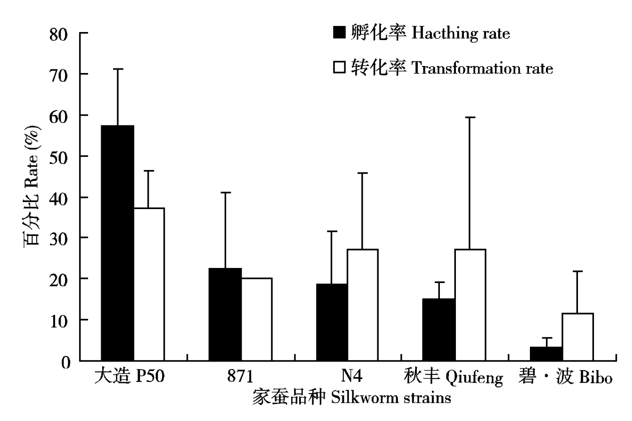


图 6 不同家蚕品种的孵化率和转化率比较

Fig. 6 Comparsion of the hatching rate and transformation rate between different injected *Bombyx mori* strains

2.2.6 不同注射蚕品种的孵化率与转化率比较：不同的蚕品种由于在基因组结构上的微小差异以及不同地理环境和饲养条件下的长期驯化，其后代蚕卵已在构造或对外界条件的适应性等方面产生了较大差异，因而有必要比较不同的蚕品种在转基因操作的效率上是否存在差异。本文以多化性蚕品种 N4 为对照，比较了二化性滞育蚕品种大造、871、秋丰、碧・波的孵化率与转化率。结果发现：不同蚕品种间孵化率和转化率的差异较为明显，其中华系蚕品种 871、秋丰的孵化率和转化率与对照基本相近，而日系杂交蚕品种碧・波的孵化率和转化率均明显低于对照，国际通用实验用种大造（华系纯种）的孵化率和转化率则均高于其他品种（图 6）。

2.2.7 不同荧光检测时间对转基因效率的影响：目前已有报道中，家蚕转基因阳性个体的筛选标记多采用由广谱性（如 A3）或特异启动子（如 3 × p3）启动的荧光标记基因。然而，强烈的紫外线照射容易伤害甚至直接杀死尚在发育中的胚胎或刚孵化的幼虫。因此，根据启动子的特征并结合家蚕在不同发育时期的特征，选择合适的荧光检测时间就变得非常重要。本文通过对 3 种常用筛选标记在家蚕 G1 代不同发育时期或组织器官的表达强弱、荧光检测难度以及紫外线照射对家蚕的影响等进行了比较，结果如表 2 所示。可以看出，以广谱性 A3 启动子启动荧光标记的转基因蚕阳性个体在蚁蚕期（孵化后 1 - 2 d）和幼虫期、蛹及蛾期均能检测到荧光，其中幼虫期检测时荧光信号最强，蛹期检测时操作最容易，而在蚁蚕期检测对蚕的伤害最大；以特异启动子（3 × p3，眼睛和神经组织特异）启动荧光标记的转基因蚕阳性个体在卵期（产后 4 - 12 d）、蚁蚕期（孵化后 1 - 2 d）、幼虫期、蛹（化蛹初期和后期）及蛾期均能检测到荧光，但以卵期和蛹期检测最为容易且对个体伤害最小，蚁蚕期和幼虫期虽然也能够检测到荧光信号，但检测难度和对个体的伤害均高于前者（图 7）。通过比较 3 种荧光标记在两种蚕卵（滞育卵和非滞育卵）中的筛选效率，还可以看出，由 3 × p3 启动的荧光标记的筛选效率明显优于 A3，而滞育性品种因有色浆液膜对非荧光光波的吸收和过滤作用而更加易于筛选（图 8）。此外，红色荧光蛋白因具有很强的穿透作用，更适合于转基因蚕的筛选。

3 讨论

本文通过对影响家蚕转基因效率的多个关键因素进行不同条件下的比较，发现结果呈以下规律：品种的孵化率，转化率：大造 > 871 > N4 > 秋丰 > 碧・波；注射时间：孵化率 ∝ 注射时间，转化率 ∝（1/注射时间），∝ 表示正比于；供体质粒载体：pBac > pXL-BacⅡ；辅助质粒载体：pHA4PIG >

表 2　不同荧光检测时间对转基因阳性个体(G1)的影响

Table 2 Response of the transgenic silkworms to different types of fluorescence and different screening time

时期 Period	卵 Embryo (d)			蚁蚕 Newly hatched (d)			幼虫 Larva (d)	蛹 Pupa (d)		蛾 Moth (d)	
	1－3	4－6	7	8－12	1	2		1－4	5－9	1	2－4
A3-EGFP	－	－	－	－	＋	＋	＋＋	＋	＋	＋	＋
3×P3-EGFP	－	＋＋＋	＋＋	＋	＋＋	＋＋	＋＋	－	－	＋	＋＋
3×P3-DsRed	－	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	－	＋＋	＋＋
观察难度 Feaseabilty	○	○	○	○	●●	●	●●	○	○	○	●
对蚕的伤害 Harm	△	△	▲	▲▲	▲▲▲	▲▲	▲	△	△	△	△

－:观察不到 Undetectable; ＋:荧光信号很弱 Detectable with weak signal; ＋＋:可观察 Detectable; ＋＋＋:荧光信号很强 Detectable with strong signal. ○表示容易观察 Represents facile observation; ●表示难观察 Represents intractable observation; ●●表示很难观察 Represents impracticable observation; △表示几乎没有伤害 Represents minute harm; ▲表示有一定影响 Represents wee harm; ▲▲表示容易致死 Represents pestilent harm; ▲▲▲表示数秒内致死 Represents lethal harm.

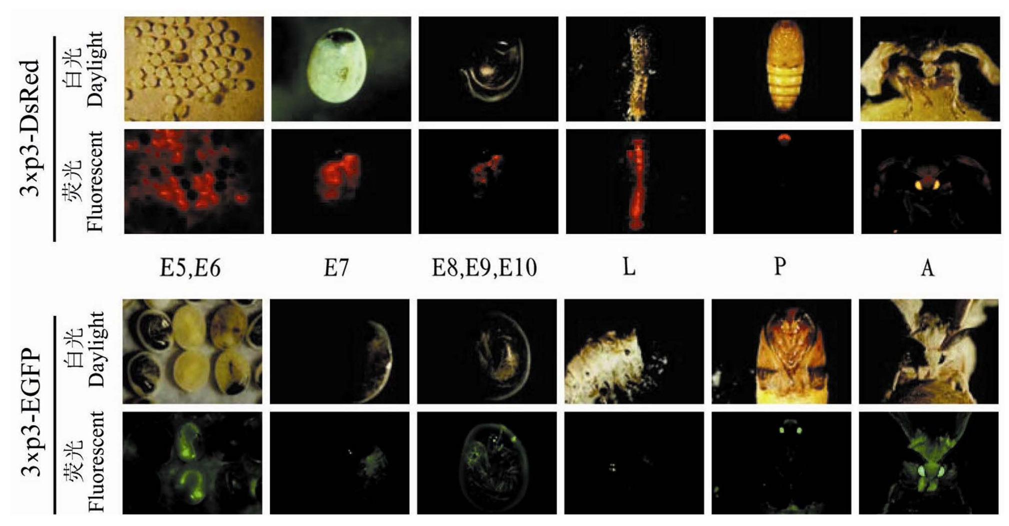


图 7　转基因蚕的荧光照片

Fig. 7 The fluorescent images of the transgenic silkworms

E5－E10：表示胚胎第 5 到第 10 天 Representing the 5th to 10th day of embryo. L，P 和 A 分别表示幼虫、蛹和成虫(蛾)。L，P，and A represent larva，pupa and adult (moth)，respectively.

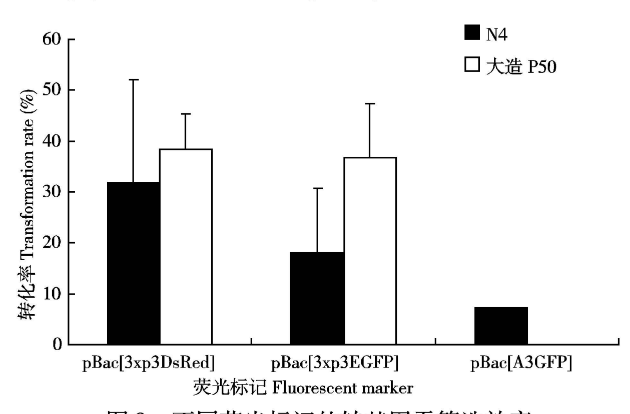


图 8　不同荧光标记的转基因蚕筛选效率

Fig. 8　Screening efficiency of transgenic silkworms by different fluorescent markers

pHA3PIG；荧光标记：3×p3DsRed＞3×p3EGFP＞＞A3EGFP，滞育性＞非滞育性。据此我们认为，建立高效家蚕转基因技术的最佳条件应包括以下几个要素：选择合适的时期进行显微注射，如在蚕卵产下后 2－3 h 之间；供体质粒宜选择可以在家蚕中发生转座的 pBac 骨架载体或者在此基础上进一步优化的载体；辅助质粒的启动子宜选择在蚕卵产下后随即开始大量表达的启动子，如家蚕肌动蛋白 A4 启动子；选用容易观察的标记并在恰当的时期筛选，如用眼睛和神经特异启动子(3×p3)启动的红色荧光蛋白(DsRed)作为标记，在胚胎发育第 4 至 6 天进行观察。除了这些主要因素外，选择产卵多、卵形大、抗逆性强、生活周期相对较短且容易解除滞育的二化性蚕品种(如大造等)将更加方便胚胎期注射和饲养观察。本研究结果显示在上述最佳条件下，蚕品种大造注射后其平均孵化率和平均转化率分别达到 62.7% 和 34.8%。

*piggy*Bac 转座子的转座发生是以转座酶首先识别其末端的特征序列并从靶位点切出为标志(Elick

et al., 1996；Mitra *et al.*, 2008），因此骨架载体中末端特征序列的完整性可能会影响转座酶的识别效率并最终影响其转座效率，本研究分别以 pBac 和 pXL-BacII 为骨架载体的转基因结果也提供了初步证据。然而在果蝇中以 pXL-BacII 为骨架载体却能够获得较高的转化效率（Li *et al.*, 2001；Li *et al.*, 2005），这说明除上述因素外，*piggy*Bac 的转座可能还受物种内在因素（如内源性的转座序列）的影响。此外，由于转座酶来源于辅助载体在早期胚胎中的瞬时表达，其表达时间和表达效率均由启动子控制并决定着转座事件是否发生以及发生的频率。本研究分别以家蚕肌动蛋白 A4 和 A3 为启动子的转基因结果亦初步证实了辅助载体中不同启动子对转基因效率存在一定影响，暗示选择在产卵后即大量和早期表达的启动子可能有助于提高转基因效率。

家蚕系典型的先行核分裂发育，成虫生殖细胞来源于早期胚胎生殖极内有限的原生殖细胞，因此，只有转座事件发生于这些细胞中才可能产生可稳定遗传的转基因蚕，这就决定了显微注射操作必须在稳定的生殖极形成之前完成。目前的报道大都选择在产卵后 3－6 h 进行注射（Tatuma *et al.*, 2000；Ogawa *et al.*, 2007），但我们的研究结果显示，尽管转化率会随注射时间的提前而升高，孵化率却会相应的降低，而选择在产卵后 2－3 h 进行注射可获得较为理想的孵化率和转化率。此外，即便严格控制在同一时间段内注射，不同蚕品种间的转化效率也有较大差异，推测其可能与不同蚕品种，尤其是滞育和非滞育性品种之间（如大造和 N4）早期胚胎发育特性的差异有关，从而造成不同蚕品种间发生最佳有效转座事件的时间有所不同，并表现在转化效率上的显著差异。

在目前的家蚕转基因研究中，大都以增强型绿色荧光蛋白（EGFP）和 DsRed 作为阳性个体的筛选标记。由于荧光蛋白的表达受其启动子的启动能力、插入片段在宿主基因组中的位置和拷贝数、宿主的密码子偏性等因素的影响，从而影响着转基因蚕的筛选效率。从本研究结果来看，选择以眼睛和神经特异启动子（3 × p3）启动具有更长激发波长的 DsRed 标记的筛选效果较为理想。但由于很难避免筛选过程中紫外线对家蚕胚胎的伤害，因此，如能选择在胚胎早期便可肉眼观察的表型突变基因来替代荧光标记基因，有望获得更好的筛选效果和效率。

迄今为止，研究人员已经在果蝇、伊蚊、蜜蜂等 20 余种昆虫中建立了基于 *piggy*Bac 的转基因技术（Xu *et al.*, 2006）。但是，有关 *piggy*Bac 的转座机理比较复杂，目前不清楚的地方甚多，所以转基因具体技术体系的建立成为研究中的重点。报道比较多的蝇、蚊、蜂等昆虫多属于多化性，其卵壳也较柔软，因此总体上讲建立转基因技术较为容易。相对而言，家蚕既有多化性也有一化、二化性，卵壳坚硬，以及其发育变态、免疫抗性、遗传特性等方面在鳞翅目昆虫中更具代表性和复杂性。就转基因技术层面上讲，高效的家蚕转基因涉及多个环节，影响其转基因效率的因素也很多，本文所探讨的诸多重要因素，将为建立高效的遗传转化体系提供帮助。随着稳定高效的家蚕转基因技术的建立，不仅可以为家蚕功能基因研究、品种分子改良和家蚕生物反应器的开发奠定基础，也将为其他昆虫特别是鳞翅目昆虫转基因技术的建立提供有用借鉴和参考。

参 考 文 献（References）

Elick TA, Bauser CA, Fraser MJ, 1996. Excision of the *piggy*Bac transposable element *in vitro* is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica*, 98: 33－41.

Guo XY, Dong L, Wang SP, Guo TQ, Wang JY, Lu CD, 2004. Introduction of foreign genes into silkworm eggs by electroporation and its application in transgenic vector test. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 36(5): 323－330.

Guo XY, Zhou ZY, Feng LC, Wang L, Lu C, Xiang ZH, 2001. Sperm-mediated gene transformation of silkworm. *Prog. Biochem. Biophys.*, 28(3): 423－425. [郭秀洋，周泽扬，冯丽春，汪琳，鲁成，向仲怀，2001. 利用精子介导法向蚕卵导入外源基因的研究. 生物化学与生物物理进展，28(3): 423－425]

Imamura M, Nakai J, Inoue S, Quan GX, Kanda T, Tamura T, 2003. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetics*, 165(3): 1 329－1 340.

Li X, Harrell RA, Handler AM, Beam T, Hennessy K, Fraser MJ Jr, 2005. *piggy*Bac internal sequences are necessary for efficient transformation of target genomes. *Insect Mol. Biol.*, 14(1): 17－30.

Li X, Lobo N, Bauser CA, Fraser MJ Jr, 2001. The minimum internal and external sequence requirements for transposition of the eukaryotic transformation vector *piggy*Bac. *Mol. Genet. Genomics*, 266(2): 190－198.

Mitra R, Fain-Thornton J, Craig NL, 2008. *piggy*Bac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *EMBO J.*, 27: 1 097－1 109.

Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, Yoshizato K, 2007. Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: Production of recombinant human serum albumin. *J. Biotechnol.*, 128: 531－544.

Sakudoh T, Sezutsu H, Nakashima T, Kobayashi I, Fujimoto H, Uchino

K, Banno Y, Iwano H, Maekawa H, Tamura T, Kataoka H, Tsuchida K, 2007. Carotenoid silk coloration is controlled by a carotenoid-binding protein, a product of the Yellow blood gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 8 941 – 8 946.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Kômoto N, Thomas J, Maucham PB, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme J, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm, *Bombyx mori* L. using a *piggy*Bac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.*, 18: 81 – 84.

Thomas JL, Da Rocha M, Besse A, Maucham PB, Chavancy G, 2002. 3 × P3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm, *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 247 – 253.

Xia QY, Zhou ZY, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306: 1 937 – 1 940.

Xu HF, Xia QY, Liu C, Cheng TC, Zhao P, Duan J, Zha XF, Liu SP, 2006. Identifiication and characterization of *piggy*Bac-like elements in the genome of domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Genet. Genomics*, 276: 31 – 40.

Yamamoto M, Yamao M, Nishiyama H, Sugihara S, Nagaoka S, Tomita M, Yoshizato K, Tamura T, Mori H, 2004. New and highly efficient method for silkworm transgenesis using *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and *piggy*Bac transposable elements. *Biotechnol. Bioeng.*, 88: 849 – 853.

Zhang MR, Chen YL, Xu HF, Liu C, Zhao P, Xia QY, 2007. Construction of red fluorescent protein reporter gene vector pBacA4DsRed and its transient expression in silkworm eggs. *J. Agric. Biotech.*, 2: 346 – 347. [张美蓉，陈玉琳，徐汉福，刘春，赵萍，夏庆友，2007. 红色荧光标记载体 pBacA4Red 的构建及其在蚕卵中的瞬时表达. 农业生物技术学报，2: 346 – 347]

Zhong BX, Li JY, Chen JE, Ye J, Yu SD, 2007. Comparison of transformation efficiency of *piggy*Bac transposon among three different silkworm *Bombyx mori* strains. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 39(2): 117 – 122.

（责任编辑：邓艳）